

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



BE

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/82, 15/29, 1/21, 5/10, A01H 5/00		A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/04114
			(43) Date de publication internationale: 6 février 1997 (06.02.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01109			(81) Etats désignés: AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Date de dépôt international: 17 juillet 1996 (17.07.96)			
(30) Données relatives à la priorité: 95/08980 19 juillet 1995 (19.07.95) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE POULENC AGROCHIMIE [FR/FR]; 14-20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DEROSE, Richard [FR/FR]; 216, rue de Saint-Cyr, F-69009 Lyon (FR). CHAUBET, Nicole [FR/FR]; Esc. C, 13 A, boulevard Wilson, F-67800 Strasbourg (FR). GIGOT, Claude [FR/FR]; Esc. C, 13 A, boulevard Wilson, F-67800 Strasbourg (FR).			
(74) Représentant commun: RHONE POULENC AGROCHIMIE; Boîte postale 9163, F-69263 Lyon Cédex 09 (FR).			Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
(54) Title: ISOLATED DNA SEQUENCE FOR USE AS A REGULATOR REGION IN A CHIMERIC GENE USEFUL FOR TRANSFORMING PLANTS			
(54) Titre: SEQUENCE ADN ISOLÉE POUVANT SERVIR DE ZONE DE REGULATION DANS UN GENE CHIMERE UTILISABLE POUR LA TRANSFORMATION DES PLANTES			
(57) Abstract <p>A chimeric gene for transforming plants is disclosed. The gene includes, in the transcription direction, at least one promoter region, one transgene and one regulator region. Said regulator region consists of at least one intron 1 in the non-coding 5' region of a plant histone gene enabling expression of the protein in rapid growth regions. The production of transgenic plants is also disclosed.</p>			
(57) Abrégé <p>Séquence ADN isolée pouvant servir de zone de régulation dans un gène chimère utilisable pour la transformation des plantes, 1) gène chimère utilisable pour la transformation des plantes. 2) Il comprend au moins, dans le sens de la transcription, une zone promotrice, un transgène et une zone de régulation, caractérisé en ce que la zone de régulation est constituée d'au moins un intron (1) dans la région 5' non-codant d'un gène d'histone végétale permettant l'expression de la protéine dans les zones de croissance rapide. 3) Production de plantes transgéniques.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

Séquence ADN isolée pouvant servir de zone de régulation dans un gène chimère utilisable pour la transformation des plantes.

5 La présente invention concerne l'utilisation de zone de régulation isolées de gènes transcrits de plantes, de nouveaux gènes chimères les contenant et leur utilisation pour la transformation des plantes.

De nombreux caractères phénotypiques associés à l'expression d'un ou quelques éléments géniques peuvent être intégrés dans le génome de plantes et conférer ainsi à ces
10 plantes transgéniques des propriétés agronomiques avantageuses. De façon non extensive on peut citer: les résistances à des agents pathogènes des cultures, la résistance à des produits phytosanitaires phytotoxiques, la production de substances à intérêt alimentaire ou pharmacologique. En plus de l'isolement et la caractérisation des éléments géniques codant pour ces différents caractères, une expression appropriée doit être assurée. Cette expression
15 appropriée peut se situer aussi bien au niveau qualitatif que quantitatif. Au niveau qualitatif, par exemple spatial: expression préférentielle dans un tissu particulier, ou temporel: expression inductible. Au niveau quantitatif par la quantité accumulée du produit d'expression du gène introduit. Cette expression appropriée dépend pour une large part de la présence d'éléments géniques de régulation associés aux transgènes, en particulier pour
20 ce qui concerne les éléments quantitatifs et qualitatifs. Parmi les éléments primordiaux assurant cette régulation appropriée, l'utilisation de zones promotrices homologues ou hétérologues, simples ou combinées a été largement décrite dans la littérature scientifique. L'utilisation de zone de régulation en aval du transgène ont été utilisées a seule fin de mettre une borne permettant d'arrêter le processus de transcription du transgène, sans
25 présumé quant à leur rôle sur la qualité ou la quantité de l'expression du transgène.

La présente invention concerne l'utilisation d'un intron 1 comme zone de régulation isolé de gènes de plantes, de nouveaux gènes chimères les contenant et leur utilisation pour la transformation des plantes. Elle concerne une séquence d'ADN isolée, pouvant servir de
30 zone de régulation dans un gène chimère utilisable pour la transformation des plantes et permettant l'expression du produit de traduction du gène chimère en particulier dans les régions de la plante en croissance rapide, qui comprend dans le sens de la transcription du gène chimère, au moins un intron tel que le premier intron (intron 1) de la région 5' non-codante d'un gène d'histone végétale. Elle concerne plus particulièrement l'utilisation
35 conjointe de l'intron 1 comme zone de régulation et de promoteurs isolés d'un même gène végétal. Elle permet l'expression appropriée à la fois quantitative et qualitative des transgènes sous le contrôle de ces éléments de régulation génique. Cette expression appropriée obtenue par l'utilisation de la présente invention peut concerner des caractères

tels que: la résistance à des agents pathogènes des cultures, la résistance à des produits phytosanitaires phytotoxiques, la production de substances à intérêt alimentaire ou pharmacologique. En particulier, elle permet de conférer aux plantes transgéniques une tolérance accrue à des herbicides par une expression préférentielle, qualitative et quantitative, du produit d'expression des gènes chimères dans les régions de la plante en croissance rapide. Cette expression appropriée particulière du gène de résistance herbicide est obtenue par utilisation conjointe des éléments de régulation promoteur et d'au moins un intron 1 comme zone de régulation du gène d'histone de type "H3.3-like". Un tel profil d'expression peut être obtenu pour tous les caractères présentant un intérêt, tels que décrit ci-dessus, avec les éléments de régulation utilisés pour conférer une tolérance herbicide accrue. La présente invention concerne également les cellules végétales transformées à l'aide de ces gènes et les plantes transformées régénérées à partir de ces cellules ainsi que les plantes issues de croisements utilisant ces plantes transformées.

Parmi les produits phytosanitaires utilisés pour la protection des cultures, les produits systémiques sont caractérisés en ce qu'ils sont véhiculés dans la plante après application et, pour certain d'entre eux, s'accumulent dans les parties en croissance rapide, notamment les apex caulinaires et racinaires, provoquant, dans le cas des herbicides, l'altération, jusqu'à la destruction, des plantes sensibles. Pour certain des herbicides présentant ce type de comportement, le mode d'action primaire est connu et résulte d'une inactivation d'enzymes caractérisées impliquées dans des voies de biosynthèse de composés nécessaires au bon développement des plantes cibles. Les enzymes cibles de ces produits peuvent être localisées dans différents compartiments subcellulaire et l'observation du mode d'action de produits connus montre le plus souvent une localisation dans le compartiment plastidial.

La tolérance des plantes sensibles à un produit appartenant à ce groupe d'herbicides, et dont la cible primaire est connue, peut-être obtenue par introduction stable dans leur génome d'un gène codant pour l'enzyme cible, d'origine phylogénétique quelconque, mutée ou non quant aux caractéristiques d'inhibition par l'herbicide du produit de l'expression de ce gène. Une autre approche consiste à introduire de façon stable dans le génome des plantes sensibles un gène d'origine phylogénétique quelconque codant pour une enzyme capable de réaliser une métabolisation de l'herbicide en un composé inactif et non toxique pour le développement de la plante. Dans ce dernier cas, il n'est pas nécessaire d'avoir caractérisé la cible de l'herbicide.

Etant donné le mode de distribution et d'accumulation des produits de ce type dans les plantes traitées, il est intéressant de pouvoir exprimer le produit de la traduction de ces gènes de façon à permettre leur expression préférentielle et leur accumulation dans les régions de la plante en croissance rapide où ces produits s'accumulent. De plus, et dans le cas où la cible de ces produits est localisée dans un compartiment cellulaire autre que le

cytoplasme, il est intéressant de pouvoir exprimer le produit de la traduction de ces gènes sous forme d'un précurseur contenant une séquence polypeptidique permettant l'adressage de la protéine conférant la tolérance dans le compartiment adéquat, et en particulier dans le compartiment plastidial.

5 A titre d'exemple illustrant cette approche on peut citer le glyphosate, le sulfosate ou la fosamétine qui sont des herbicides systémiques à large spectre de la famille des phosphonométhylglycines. Ils agissent essentiellement comme inhibiteurs compétitifs vis à vis du PEP (phosphoénolpyruvate) de la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS, EC 2.5.1.19). Après leur application sur la plante, ils sont véhiculés dans la plante
10 où ils s'accumulent dans les parties en croissance rapide, notamment les apes caulinaires et racinaires, provoquant l'altération, jusqu'à la destruction, des plantes sensibles.

L'EPSPS, cible principale de ces produits est une enzyme de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques localisée dans le compartiment plastidial. Cette enzyme est codée par un ou des gènes nucléaires et synthétisée sous forme d'un précurseur
15 cytoplasmique puis importée dans les plastes où elle s'accumule sous sa forme mature.

La tolérance des plantes au glyphosate et aux produits de la famille est obtenue par l'introduction stable dans leur génome d'un gène d'EPSPS d'origine végétale ou bactérienne, mutée ou non quant aux caractéristiques d'inhibition par le glyphosate du produit de ce gène. Etant donné le mode d'action du glyphosate, il est intéressant de
20 pouvoir exprimer le produit de la traduction de ce gène de façon à permettre son accumulation importante dans les plastes et de plus, dans les régions de la plante en croissance rapide où les produits s'accumulent.

Il est connu, par exemple d'après le brevet américain 4 535 060, de conférer à une plante une tolérance à un herbicide du type ci-dessus, en particulier la N-phosphonométhylglycine ou glyphosate, par introduction dans le génome des plantes d'un
25 gène codant pour une EPSPS portant au moins une mutation rendant cette enzyme plus résistante à son inhibiteur compétitif (le glyphosate), après localisation de l'enzyme dans le compartiment plastidial. Ces techniques demandent cependant à être améliorées pour une plus grande fiabilité dans l'emploi de ces plantes lors d'un traitement par ces produits dans
30 des conditions agronomiques.

Dans la présente description, on entend par "plante" tout organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse et par "cellule végétale" toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, ou des tissus différenciés tels que des embryons ou des parties de plantes ou des plantes ou des
35 semences. On entend par "l'intron 1 d'arabidopsis comme zone de régulation" une séquence d'ADN isolée de longueur variable, située en amont de la partie codante ou correspondant à la partie structurale d'un gène transcrit. On entend par gène de tolérance à un herbicide tout gène, d'origine phylogénétique quelconque, codant soit pour l'enzyme cible de l'herbicide,

présentant ou non une ou des mutations quant aux caractéristiques d'inhibition par l'herbicide, soit pour une enzyme capable de métaboliser l'herbicide en un composé inactif et non toxique pour la plante. On entend par zones de la plante en croissance rapide, les régions qui sont le siège de multiplications cellulaires importantes, en particulier les régions apicales.

La présente invention concerne la production de plantes transformées ayant notamment une tolérance accrue à des herbicides s'accumulant dans les zones en croissance rapides des plantes traitées, par régénération de cellules transformées à l'aide de nouveaux gènes chimères comportant un gène de tolérance à ces produits. L'invention a également pour objet la production de plantes transformées ayant une tolérance accrue aux herbicides de la famille des phosphonométhylglycines par régénération de cellules transformées à l'aide de nouveaux gènes chimères comportant un gène de tolérance à ces herbicides. L'invention concerne également ces nouveaux gènes chimères, ainsi que des plantes transformées plus tolérantes en raison d'une meilleure tolérance dans les parties en croissance rapide de ces plantes, ainsi que les plantes issues de croisements utilisant ces plantes transformées. Elle a également pour objet du nouvel intron 1 d'histone végétale et son utilisation comme zone de régulation pour la construction des gènes chimères ci-dessus.

Plus particulièrement, l'invention a pour objet un gène chimère pour conférer aux plantes notamment une tolérance accrue vis à vis d'un herbicide ayant pour cible l'EPSPS, comprenant, dans le sens de la transcription, une zone promotrice, une zone peptide de transit, une séquence codant pour une enzyme de tolérance aux produits de la famille des phosphonométhylglycines et une zone de régulation, caractérisé en ce que la zone de régulation est constituée d'un fragment d'un l'intron 1 d'un gène d'histone végétale dans une orientation quelconque relativement à son orientation initiale dans le gène duquel il dérive, permettant l'expression préférentielle et l'accumulation de la protéine de tolérance à l'herbicide dans les zones d'accumulation du dit herbicide.

Le gène d'histone, dont est issu le l'intron 1 selon l'invention, provient d'une plante monocotylédone telle que par exemple le blé, le maïs ou le riz ou de préférence d'une plante dicotylédone telle que par exemple la luzerne, le tournesol, le soja, le colza ou de préférence *Arabidopsis thaliana*. On utilise de préférence un gène d'histone du type "H3.3-like".

La zone peptide de transit comprend, dans le sens de la transcription, au moins un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de la séquence de la partie mature N-terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, de préférence le gène de la petite sous-unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO) selon la demande de brevet européen/ PCT 508 909. Cette zone caractéristique a comme rôle de permettre le

relargage dans le compartiment plastidial d'un polypeptide mature avec une efficacité maximale, de préférence sous forme native.

La séquence codante utilisable dans le gène chimère selon l'invention provient d'un gène de tolérance herbicide d'origine phylogénétique quelconque. Cette séquence peut être
5 notamment celle de l'EPSPS mutée ayant un degré de tolérance au glyphosate.

La zone promotrice selon la demande de brevet européen/ PCT 507 698 peut être d'origine quelconque, sous forme simple ou dupliquée ou combinée d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes, c'est à dire, par exemple bactérienne telle que celle du gène de la nopaline synthase, ou virale telle que celle du transcrit 35S du virus de la mosaïque
10 du chou-fleur, ou de préférence végétale telle que celle de la petite sous-unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase ou de préférence telle que celle d'un gène d'histone végétale et de préférence d'*Arabidopsis thaliana*. On utilise de préférence un gène d'histone du type "H4".

Le gène chimère selon l'invention peut comprendre, en plus des parties essentielles
15 ci-dessus, une zone intermédiaire non traduite (linker) entre la zone promotrice et la zone codante ainsi qu'entre la zone codante et l'intron 1 et qui peut être d'origine phylogénétique quelconque.

Les exemples suivants illustrent à titre limitatif mais non limitatif plusieurs aspects de l'invention: l'isolement des introns selon l'invention et leur utilisation pour la
20 transformation génétiques des plantes ainsi que les qualités améliorées d'expression des gènes hétérologues des plantes transformées à l'aide de ces introns.

EXEMPLE 1:

1. Obtention d'un fragment d'EPSPS d' *Arabidopsis thaliana*

25 a) deux oligonucleotides 20-mers de séquences respectives:

5'- GCTCTGCTCATGTCTGCTCC -3'

5'- GCCCGCCCTTGACAAAGAAA -3'

ont été synthétisés à partir de la séquence d'un gène d'EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* (Klee H.J. et al. (1987) Mol. Gen. Genet., 210, 437-442). Ces deux oligonucleotides sont
30 respectivement en position 1523 à 1543 et 1737 à 1717 de la séquence publiée et en orientation convergente.

b) L'ADN total d'*Arabidopsis thaliana* (var. *columbia*) a été obtenu chez Clontech (référence catalogue: 6970-1)

c) On mélange 50 nanogrammes(ng) d'ADN avec 300ng de chacun des
35 oligonucleotides et soumis à 35 cycles d'amplification avec un appareil Perkin-Elmer 9600, dans les conditions de milieu standard pour l'amplification préconisées par le fournisseur. Le fragment de 204pb résultant constitue le fragment d'EPSPS d' *Arabidopsis thaliana*.

2. Construction d'une bibliothèque d'un ADNc à partir d'une ligne cellulaire de maïs BMS.

a) On broye 5 g de cellules filtrées dans l'azote liquide et les acides nucléiques totaux extraits selon la méthode décrite par Shure et al. avec les modifications suivantes:

- 5 - le pH du tampon de lyse est ajusté à PH = 9,0;
 -après la précipitation par l'isopropanol, le culot est repris dans l'eau et après dissolution, ajusté à 2,5 M LiCl. Après incubation pendant 12 h à °OC, le culot de la centrifugation de 15 min. à 30000g à 4°C est resolubilisé. L'étape de précipitation par LiCl est alors répétée. Le culot resolubilisé constitue la fraction
10 ARN des acides nucléiques totaux.

b) La fraction ARN-polyA+ de la fraction ARN est obtenue par chromatographie sur colonne oligo-dT cellulose telle que décrite dans "Current Protocols in Molecular Biology".

- c) Synthèse d'ADNc double brin à extrémité synthétique EcoRI: elle est réalisée en
15 suivant le protocole du fournisseur des différents réactifs nécessaires à cette synthèse sous forme d'un kit:le "copy kit" de la société In Vitrogen.

Deux oligonucleotides simples brins et partiellement complémentaires de séquences respectives:

5'- AATTCCCGGG -3'

- 20 5'- CCCGGG- 3' (ce dernier étant phosphorylé)

sont ligués avec les ADNc double brin à extrémités franches.

Cette ligation des adaptateurs résulte en la création de sites Sma I accolés aux ADNc double brin et EcoRI sous forme cohésive à chaque extrémité des ADNc double brin.

d) Création de la bibliothèque:

- 25 Les ADNc présentant à leurs extrémités les sites artificiels cohésifs EcoRI sont ligués avec le ADNc du bactériophage λ gt10 coupé par EcoRI et déphosphorylé selon le protocole du fournisseur Naew England Biolabs.

- Une aliquote de la réaction de ligation a été encapsidée *in vitro* avec des extraits d'encapsulation: Gigapack Gold selon les instructions du fournisseur, cette librairie
30 a été titrée en utilisant la bactérie *E.coli* C600hfl. la librairie ainsi obtenue est amplifiée et stockée selon les instructions du même fournisseur et constitue la librairie de ADNc de suspension cellulaire de maïs BMS.

3. Criblage de la bibliothèque de ADNc de suspension cellulaire de maïs BMS avec la sonde EPSP d'*Arabidopsis thaliana*:

Le protocole suivi est celui de "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes 1 et 2, Ausubel F.M. et al , publiés par Greene Publishing Associates et Wiley-Interscience (1989)(CPMB). En bref, environ 10^6 phages recombinants sont étalés sur boîte LB à une

densité moyenne de 100 phages /cm². Les plages de lyses sont répliquées en double sur membrane Hybond N d'Amersham.

L'ADN a été fixé sur les filtres par traitement UV 1600kJ (Stratalinker de Stratagene). Les filtres ont été préhybridés dans: 6xSSC/0,1%SDS/0,25 lait écrémé pendant 2h à 65°C.

- 5 La sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* a été marquée au ³²P-dCTP par "random-priming" selon les instructions du fournisseur (Kit Ready to Go de Pharmacia). L'activité spécifique obtenue est de l'ordre de 10⁸ cpm par µg de fragment. Après dénaturation pendant 5 min à 100°C, la sonde est ajoutée dans le milieu de préhybridation et l'hybridation est poursuivie pendant 14 heures à 55°C. Les filtres sont fluorographiés 48h à 10 -80°C avec un film KodakXAR5 et des écrans renforceurs Hyperscreen RPN d'Amersham. L'alignement des spots positifs sur le filtre avec les boîtes d'où ils sont issus permet de prélever, sur la boîte, des zones correspondant aux phages présentant une réponse d'hybridation positive avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*. Cette étape d'étalement, transfert, hybridation, récupération est répétée jusqu'à ce que tous les spots de 15 la boîte des phages successivement purifiés se révèlent positifs à 100% en hybridation. Une plage de lyse par phage indépendant est alors prélevée dans du milieu λ diluant (Tris-Cl pH= 7,5; MgSO₄ 10mM; NaCl 0,1M; gélatine 0,1%), ces phages en solution constituant les clones positifs de l' EPSPS de la suspension cellulaire de maïs .

20 **4. Préparation et analyse de l'ADN des clones EPSPS de la suspension cellulaire de maïs BMS.**

On ajoute environ 5.10⁸ phages à 20 ml de bactéries C600hfl à 2 OD 600nm/ml et incubés 15 minutes à 37°C. Cette suspension est alors diluée dans 200ml de milieu de croissance des bactéries dans un Erlen de 1 l et agitée dans un agitateur rotatif à 250 rpm. 25 La lyse est constatée par clarification du milieu, correspondant à 1 lyse des bactéries turbides et se produit après environ 4 h d'agitation. Ce surnageant est alors traité comme décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". L'ADN obtenu correspond aux clones d'EPSPS de la suspension cellulaire de maïs BMS.

- Un à deux µg de cet ADN sont coupés par EcoRI et séparés sur gel d'agarose 30 LGTA/TBE (réf. CPMB) à 0,8%. Une dernière vérification consiste à s'assurer que l' ADN purifié présente bien un signal d'hybridation avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*. Après l'électrophorèse, les fragments d'ADN sont transférés sur membrane Hybond N d'Amersham selon le protocole de Southern décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". Le filtre est hybridé avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* selon les 35 conditions décrites au paragraphe 3 ci-dessus. Le clone présentant un signal d'hybridation avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* et contenant le plus long fragment EcoRI a une taille estimée sur gel à environ 1,7kpb.

5. Obtention du clone pRPA-ML-711:

Dix µg de l'ADN du clone phagique contenant l'insert de 1,7kpb sont digérés par EcoRI et séparés sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) à 0,8%. Le fragment de gel contenant l'insert de 1,7kpb est excisé du gel par coloration BET et le fragment est traité à la β-agarse selon le protocole du fournisseur New England Biolabs. L'ADN purifié du fragment de 1,7kpb est ligué à 12°C pendant 14h avec l'ADN du plasmide pUC 19 (New England Biolabs) coupé par EcoRI selon le protocole de ligation décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". Deux µl du mélange de ligation ci-dessus sont utilisés pour la transformation d'une aliquote d'E.coli DH10B électro compétentes ; la transformation se fait par électroporation en utilisant les conditions suivantes: le mélange de bactéries compétentes et de milieu de ligation est introduit dans une cuvette d'électroporation d'épaisseur 0,2cm (Biorad) préalablement refroidie à 0°C. Les conditions physiques de l'électroporation utilisant un électroporateur de marque Biorad sont 2500 Volts, 25 µFarad et 200 Ω. Dans ces conditions, le temps de décharge moyen de condensateur est de l'ordre de 4,2 millisecondes. Les bactéries sont alors reprises dans 1 ml de milieu SOC (réf. CPMB) et agitées pendant 1 heure à 200 rpm sur un agitateur rotatif dans des tubes Corning de 15 ml. Après étalement sur milieu LB/agar supplémenté à 100 µg/ml de carbéniciline, les mini-préparations des clones bactériens ayant poussé après une nuit à 37 °C est réalisée selon le protocole décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". Après digestion par EcoRI de l'ADN et séparation en électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) à 0,8%, les clones présentant un insert de 1,7kpb sont conservés. Une dernière vérification consiste à s'assurer que l'ADN purifié présente bien un signal d'hybridation avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*. Après l'électrophorèse, les fragments d'ADN sont transférés sur membrane Hybond N d'Amersham selon le protocole de Southern décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". Le filtre est hybridé avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* selon les conditions décrites au paragraphe 3 ci-dessus. Le clone plasmidique présentant un insert de 1,7kpb et hybridant avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* a été préparé à plus grande échelle et l'ADN résultant de la lyse des bactéries purifié sur gradient de CsCl ainsi que décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". L'ADN purifié a été partiellement séquencé avec un kit Pharmacia en suivant les instructions du fournisseur et en utilisant comme amorces, les amorces universelles de M13 directes et inverses commandées chez le même fournisseur. La séquence partielle réalisée couvre environ 0,5 kpb. La séquence dérivée en acides aminés dans la région de la protéine mature (environ 50 résidus acides aminés) présente une identité de 100% avec la séquence aminée correspondante de l'EPSPS mature de maïs décrite dans le brevet américain USP 4 971 908). Ce clone correspondant à un fragment EcoRI de 1,7kpb de l'ADN de l'EPSP de la suspension cellulaire de maïs BMS a été nommé pRPA-ML-711. La séquence complète de

ce clone a été réalisée sur les deux brins en utilisant le protocole du kit Pharmacia et en synthétisant des oligonucléotides complémentaires et de direction opposée tous les 250 pb environ. La séquence complète de ce clone de 1713 pb obtenue est présentée par SEQ ID N° 1.

5

6. Obtention du clone pRPA-ML-715:

L'analyse de la séquence du clone pRPA-ML-711 et en particulier la comparaison de la séquence d'acides aminés dérivés avec celle de maïs montre une extension de séquence de 92 pb en amont du codon GCG codant pour l'Alanine NH₂-terminale de la partie mature de l'EPSPS de maïs (brevet américain USP 4 971 908). De même une extension de 288 pb en aval du codon AAT codant pour l'asparagine COOH-terminale de la partie mature de l'EPSPS de maïs (brevet américain USP 4 971 908) est observée. Ces deux parties pourraient correspondre, pour l'extension NH₂-terminale à une portion de la séquence d'un peptide de transit pour la localisation plastidiale et pour l'extension COOH-terminale à la région 3' non traduite de l'ADNc.

15 Afin d'obtenir un ADNc codant pour la partie mature de l'ADNc de l'EPSPS de maïs, telle que décrite dans l'USP 4 971 908, les opérations suivantes ont été réalisées:

a) Élimination de la région 3' non traduite: construction de pRPA-ML-712:

Le clone pRPA-ML-711 a été coupé par l'enzyme de restriction AseI et les extrémités 20 résultant de cette coupure rendues franches par traitement avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I selon le protocole décrit dans CPMB. Une coupure par l'enzyme de restriction SacII a ensuite été effectuée. L'ADN résultant de ces opérations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 1%.

Le fragment de gel contenant l'insert "AseI-extrémités franches/SacII" de 0,4 kpb a 25 été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus. L'ADN du clone pRPA-ML-711 a été coupé par l'enzyme de restriction HindIII située dans le polylinker du vecteur de clonage pUC19 et les extrémités résultant de cette coupure ont été rendues franches par traitement avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I. Une coupure par l'enzyme de restriction SacII a ensuite été effectuée. L'ADN résultant de ces 30 manipulations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 0,7%.

Le fragment de gel contenant l'insert HindIII-extrémités franches/SacII de environ 3,7kpb a été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus.

Les deux inserts ont été ligués, et 2 µl du mélange de ligation ont servi à 35 transformer *E. coli* DH10B ainsi que décrit plus haut au paragraphe 5.

On analyse le contenu en ADN plasmidique de différents clones selon la procédure décrite pour pRPA-ML-711. Un des clones plasmidique retenu contient un insert EcoRI-HindIII de 1,45 kpb environ. La séquence des extrémités terminales de ce clone révèle que

l'extrémité 5' de l'insert correspond exactement à l'extrémité correspondante de pRPA-ML-711 et que l'extrémité 3' terminale présente la séquence suivante:

" 5'-...AATTAAGCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT-3' ".

La séquence soulignée correspond au codon de l'acide aminé COOH-terminal asparagine, le codon suivant correspondant au codon stop de la traduction. Les nucléotides en aval correspondent à des éléments de séquence du polylinker de pUC19. Ce clone comprenant la séquence de pRPAML-711 jusqu'au site de terminaison de la traduction de l'EPSPS mature de maïs et suivie de séquences du polylinker de pUC 19 jusqu'au site HindIII a été nommé **pRPA-ML-712**.

10 **b) Modification de l'extrémité 5' de pRPA-ML-712: construction de pRPA-ML-715**

Le clone pRPA-ML-712 a été coupé par les enzymes de restrictions PstI et HindIII. L'ADN résultant de ces manipulations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 0,8%. Le fragment de gel contenant l'insert PstI/EcoRI de 1,3 kpb a été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus. Cet insert a été mis en ligation en présence de quantité équimoléculaire de chacun des deux oligonucléotides partiellement complémentaires, de séquence:

Oligo1: 5'-GAGCCGAGCTCCATGGCCGGCGCCGAGGAGATCGTGCTGCA-3'

Oligo 2: 5'-GCACGATCTCCTCGGCGCCGGCCATGGAGCTCGGCTC-3'

20 ainsi qu'en présence d'ADN du plasmide pUC19 digéré par les enzymes de restrictions BamHI et HindIII.

Deux µl du mélange de ligation ont servi à transformer *E. coli* DH10B ainsi que décrit plus haut au paragraphe 5. Après analyse du contenu en ADN plasmidique de différents clones selon la procédure décrite ci-dessus au paragraphe 5, un des clones 25 présentant un insert d'environ 1,3 kpb a été conservé pour analyses ultérieures. La séquence de l'extrémité 5' terminale du clone retenu révèle que la séquence ADN dans cette région est la suivante: séquence du polylinker de pUC19 des sites EcoRI à BamHI, suivi de la séquence des oligonucléotides utilisés lors du clonage, suivi du reste de la séquence présente dans pRPAML-712. Ce clone a été nommé **pRPA-ML-713**. Ce clone présente 30 un codon methionine ATG inclu dans un site NcoI en amont du codon Alanine N-terminal de l'EPSPSynthase mature. De plus, les codons alanine et glycine de l'extrémité N-terminale ont été conservées, mais modifiées sur la troisième base variable : GCGGGT initial donne GCCGGC modifié.

Le clone **pRPA-ML-713** a été coupé par l'enzyme de restriction HindIII et les 35 extrémités de cette coupure rendues franches par traitement avec le fragment de Klenow de la ADN polymérase I. Une coupure par l'enzyme de restriction SacI a ensuite été effectuée. L'ADN résultant de ces manipulations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 0,8%. Le fragment de gel contenant l'insert "HindIII-extrémités

franches/SacI" de 1.3 kpb a été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus. Cet insert a été mis en ligation en présence d'ADN du plasmide pUC19 digéré par l'enzyme de restriction XbaI et les extrémités de cette coupure rendues franches par traitement avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I. Une coupure par l'enzyme de restriction SacI a ensuite été effectuée. Deux µl du mélange de ligation ont servi à transformer *E. coli* DH10B ainsi que décrit plus haut au paragraphe 5. Après analyse du contenu en ADN plasmidique de différents clones selon la procédure décrite ci-dessus au paragraphe 5, un des clones présentant un insert d'environ 1,3 kpb a été conservé pour analyses ultérieures. La séquence des extrémités terminales du clone retenu révèle que la séquence ADN est la suivante: séquence du polylinker de pUC19 des sites EcoRI à SacI, suivie de la séquence des oligonucléotides utilisés lors du clonage déletée des 4 pb GATCC de l'oligonucléotide 1 décrit ci-dessus, suivi du reste de la séquence présente dans pRPA-ML-712 jusqu'au site HindIII et séquence du polylinker de pUC19 de XbaI à HindIII. Ce clone a été nommé pRPA-ML-715.

15

7) Obtention d'un ADNc codant pour une EPSPS de maïs mutée

Toutes les étapes de mutagenèse ont été réalisées avec le U.S.E. mutagenesis kit de Pharmacia en suivant les instructions du fournisseur. Le principe de ce système de mutagenèse est le suivant: l'ADN plasmidique est dénaturé par la chaleur et réassocié en présence d'un excès molaire d'une part de l'oligonucléotide de mutagenèse, et d'autre part d'un oligonucléotide permettant d'éliminer un site d'enzyme de restriction unique présent dans le polylinker. Après l'étape de réassociation, la synthèse du brin complémentaire est réalisée par l'action de la T4 ADN polymérase en présence de T4 ADN ligase et de protéine du gène 32 dans un tampon approprié fourni. Le produit de synthèse est incubé en présence de l'enzyme de restriction, dont le site est supposé avoir disparu par mutagenèse. La souche d'*E. coli* présentant, en particulier, la mutation mutS est utilisée comme hôte pour la transformation de cet ADN. Après croissance en milieu liquide, l'ADN plasmidique total est préparé, incubé en présence de l'enzyme de restriction utilisée précédemment. Après ces traitements, la souche d'*E. coli* DH10B est utilisée comme hôte pour la transformation. L'ADN plasmidique des clones isolés est préparé et la présence de la mutation introduite vérifiée par séquençage.

A)- modifications de sites ou de séquence sans incidence a priori sur le caractère de résistance de l'EPSPS de maïs aux produits inhibiteurs compétitifs de l'activité EPSP synthase: élimination d'un site NcoI interne de pRPA-ML-715.

La séquence de pRPA-ML-715 est numérotée arbitrairement en plaçant la première base du codon Alanine N-terminal GCC en position 1. Cette séquence présente un site NcoI en position 1217. L'oligonucléotide de modification du site présente la séquence :

5'-CCACAGGATGGCGATGGCCTTCTCC-3'.

Après séquençage selon les références données ci-dessus, la séquence lue après mutagenèse correspond à celle de l'oligonucléotide utilisé. Le site NcoI a bien été éliminé et la traduction en acides aminés dans cette région conserve la séquence initiale présente sur pRPA-ML-715.

5 Ce clone a été nommé pRPA-ML-716.

La séquence de 1340 bp de ce clone est présentée SEQ ID N° 2 et SEQ ID N° 3.

B) modifications de séquence permettant l'augmentation du caractère de résistance de l'EPSPS de maïs aux produits inhibiteurs compétitifs de l'activité EPSP synthase.

10 Les oligonucléotides suivants ont été utilisés :

a) mutation Thr 102 \Rightarrow Ile.

5'-GAATGCTGGAATCGCAATGCGGCCATTGACAGC-3'

b) mutation Pro 106 \Rightarrow Ser.

15 5'-GAATGCTGGAACTGCAATGCGGTCCTTGACAGC-3'

c) mutations Gly 101 \Rightarrow Ala et Thr 102 \Rightarrow Ile.

5'-CTTGGGGAATGCTGCCATCGCAATGCGGCCATTG-3'

20 d) mutations Thr 102 \Rightarrow Ile et Pro 106 \Rightarrow Ser.

5'-GGGGAATGCTGGAATCGCAATGCGGTCCTTGACAGC-3'

Après séquençage, la séquence lue après mutagenèse sur les trois fragments mutés est identique à la séquence de l'ADN parental pRPA-ML-716 à l'exception de la région mutagenisée qui correspond à celle des oligonucléotides de mutagenèse utilisés. Ces clones ont été nommés : pRPA-ML-717 pour la mutation Thr 102 \Rightarrow Ile, pRPA-ML-718 pour la mutation Pro 106 \Rightarrow Ser, pRPA-ML-719 pour les mutations Gly 101 \Rightarrow Ala et Thr 102 \Rightarrow Ile et pRPA-ML-720 pour les mutations Thr 102 \Rightarrow Ile et Pro 106 \Rightarrow Ser.

La séquence de 1340 bp de pRPA-ML-720 est présentée SEQ ID N° 4 et SEQ ID N° 30 5.

L'insert NcoI-HindIII de 1395 pb sera nommé dans la suite des descriptions "le double mutant de l'EPSPS de maïs".

35 EXEMPLE 2: Construction de gènes chimères

On effectue la construction de gènes chimères selon l'invention à partir des éléments suivants:

1). On isole le clone génomique (clone cosmide c22) d'*Arabidopsis thaliana* contenant deux gènes du type "H3.3-like" comme décrit dans Chaubet et al (J. Mol. Biol. 1992. 225 569-574).

2). intron n°1:

5 On purifie un fragment d'ADN de 418 paires de bases à partir de la digestion du clone cosmide c22 avec l'enzyme de restriction *DdeI* suivie d'un traitement avec un fragment de Klenow d'ADN polymérase de *E.coli.*, selon les instructions du fabricant pour créer un fragment d'ADN à extrémité franche puis coupé avec *MseI*. Le fragment ADN purifié est ligaturé à un adaptateur oligonucléotide synthétique ayant la séquence suivante:

10 adaptateur 1: 5' TAATTTGTTGAACAGATCCC 3'
TAAACAACCTTGTCTAGGG

Le produit de ligation est cloné dans pGEM7Zf(+) (catalogue Stratagene n° P2251) qui a été digéré par *SmaI*. Ce clone, appelé "intron n°1", est vérifié par séquençage (SEQ ID 6).

15 3). intron n°2:

On purifie un fragment d'ADN de 494 paires de bases à partir de la digestion du clone cosmide c22 avec les enzymes de restriction *AluI* et *CfoI*. Le fragment ADN purifié est ligaturé à un adaptateur oligonucléotide synthétique ayant la séquence suivante:

20 adaptateur 2: 5' CAGATCCCGGATCTGCG 3'
GCGTCTAGGGCCCTAGACGC

Le produit de ligation est cloné dans pGEM7Zf(+) (catalogue Stratagene n° P2251) qui a été digéré par *SmaI*. Ce clone, appelé "intron n°2", est vérifié par séquençage (SEQ ID 7).

25 4). pRA-1

La construction de ce plasmide est décrite dans la demande française 9308029. Ce plasmide est un dérivé de pBI 101.1 (Catalogue Clontech n° 6017-1) qui contient le promoteur d'histone d'*Arabidopsis* H4A748 régulant la synthèse du gène de la β -glucoronidase de *E.coli* et du site de polyadénylation de la nopaline synthase (NOS").

30 Ainsi on obtient un gène chimère de structure:

" promoteur H4A748- gène GUS- NOS"

5). pCG-1

Ce plasmide contient l'intron n°1 ci-dessus placé entre le promoteur H4A748 et la région codante GUS de pRA-1. Ce plasmide est obtenu par digestion de clone cosmide c22 avec *BamHI* et *SmaI*. L'intron n°1 de 418 paires de bases est directement ligaturé dans pRA-1 qui a été digéré avec *BamHI* et *SmaI*.

Ainsi on obtient un gène chimère de structure:

" promoteur H4A748- intron n°1-gène GUS- NOS"

6). pCG-13

Ce plasmide contient l'intron n°2 ci-dessus placé entre le promoteur H4A748 et la région codante GUS de pRA-1. Ce plasmide est obtenu par digestion de clone cosmide c22 avec *BamHI* et *SmaI*. L'intron n°2 de 494 paires de bases est directement ligaturé dans pRA-1 qui a été digéré avec *BamHI* et *SmaI*.

Ainsi on obtient un gène chimère de structure:

"promoteur H4A748- intron n°2-gène GUS- NOS"

7). pCG-15

Ce plasmide contient seulement l'intron n°1 devant la séquence codante GUS de ci-dessus placé entre le promoteur H4A748 et la région codante GUS de pCG-1. Ce plasmide est obtenu par digestion de pCG-1 avec *BamHI* et *HindIII* suivie d'un traitement avec un fragment de Klenow d'ADN polymérase de *E.coli.*, selon les instructions du fabricant pour créer un fragment d'ADN à extrémité franche.

Ce vecteur est alors religaturé pour donner un gène chimère de structure:

"intron n°1-GUS-NOS"

8). pCG-18

Ce plasmide contient seulement l'intron n°2 ci-dessus devant la séquence codante GUS de pCG-13. Ce plasmide est obtenu par digestion partielle de pCG-13 avec *BamHI* et *SphI*, suivie d'un traitement avec un fragment de d'ADN polymérase de phage T4, selon les instructions du fabricant pour créer un fragment d'ADN à extrémité franche.

Ce vecteur est alors religaturé et vérifié par digestion enzymatique pour donner un gène chimère de structure:

"intron n°2-GUS-NOS"

9). pRPA-RD-124

Addition d'un signal de polyadénylation "nos" à pRPA-ML-720 avec création d'une cassette de clonage contenant le gène d'EPSPS double mutant de maïs (Thr 102 → Ile et Pro 106 → Ser). pRPA-ML-720 est digéré avec *Hind III*, traité avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* pour produire une extrémité franche. On effectue une seconde digestion avec *Nco I* et le fragment EPSPS est purifié. Le gène EPSPS est ensuite ligué avec pRPA-RD-12 purifié (une cassette de clonage contenant le signal de polyadénylation de la nopaline synthase) pour donner pRPA-RD-124. Pour obtenir le vecteur pRPA-RD-12 purifié utile, il a fallu que celui-ci soit préalablement digéré par *Sall*, traité avec l'ADN polymérase de Klenow, puis digéré une seconde fois avec *NcoI*.

10). pRPA-RD-125

Addition d'un peptide de transit optimisé (PTO) à pRPA-RD-124 avec création d'une cassette de clonage contenant le gène d'EPSPS ciblé sur les plasmides. pRPA-RD-7 (demande de brevet européen EP 652 286) est digérée avec *Sph I*, traité avec la T4 ADN polymérase, puis digérée avec *Spe I* et le fragment PTO est purifié. Ce fragment PTO est

cloné dans pRPA-RD-124 qui a été préalablement digérée par *NcoI*, traité avec l'ADN polymérase de Klenow pour enlever la partie protubérante 3', puis digérée par *Spe I*. Ce clone est alors séquencé pour assurer la fusion traductionnelle correcte entre le PTO et le gène d'EPSPS. On obtient alors pRPA-RD-125.

5 **11). pRPA-RD-196**

Dans ce plasmide, la partie "intron n°1 + gène de la β -glucoronidase de *E.coli.*" de pCG-1 est remplacée par un gène chimère de 2 kilobases contenant un peptide de transit optimisé de gène d'EPSPS double mutant (Ile₁₀₂ + Ser₁₀₆) et un site de polyadénylation de la nopaline synthase ("NOS") isolé de pRPA-RD-125. Pour obtenir pRPA-RD-196, on effectue la digestion de pCG-1 avec *EcoRI* et *BamHI*, suivie d'un traitement avec un fragment de klenow d'ADN polymérase de *E.coli.*, selon les instructions du fabricant pour créer un fragment d'ADN à extrémité franche. Le fragment d'ADN de 2 kilobases contenant un peptide de transit optimisé de gène d'EPSPS double mutant (Ile₁₀₂ + Ser₁₀₆ et un site de polyadénylation de la nopaline synthase ("NOS")) est obtenu à partir de pRPA-RD-125 par digestion avec *NcoI* et *NotI*, suivie d'un traitement avec l'ADN polymérase de *E.coli.*, selon les instructions du fabricant pour créer un fragment d'ADN à extrémité franche. Ce fragment à extrémité franche est alors ligaturé dans pCG-1 préparé ci-dessus.

Ainsi on obtient un gène chimère de structure:

" promoteur H4A748 - PTO - gène EPSPS de maïs - NOS"

20 **12). pRPA-RD-197**

Dans ce plasmide, la partie "gène de la β -glucoronidase de *E.coli.*" de pCG-1 est remplacée par un gène chimère de 2 kilobases contenant un peptide de transit optimisé, un gène d'EPSPS double mutant (Ile₁₀₂ + Ser₁₀₆) et un site de polyadénylation de la nopaline synthase ("NOS") isolé de pRPA-RD-125. Pour obtenir pRPA-RD-197, on effectue la digestion de pCG-1 avec *EcoRI* suivie d'un traitement avec un fragment de Klenow d'ADN polymérase de *E.coli.*, selon les instructions du fabricant pour créer un fragment d'ADN à extrémité franche puis coupé avec *SmaI*. Le fragment d'ADN de 2 kilobases contenant un peptide de transit optimisé, un gène d'EPSPS double mutant (Ile₁₀₂ + Ser₁₀₆) et un site de polyadénylation de la nopaline synthase ("NOS") est obtenu à partir de pRPA-RD-125 par digestion avec *NcoI* et *NotI*, suivie d'un traitement avec l'ADN polymérase de *E.coli.*, selon les instructions du fabricant pour créer un fragment d'ADN à extrémité franche. Ce fragment à extrémité franche est alors ligaturé dans pCG-1 préparé ci-dessus.

Ainsi on obtient un gène chimère de structure:

" promoteur H4A748 - intron n°1 - gène EPSPS de maïs - NOS"

35 **13). pRPA-RD-198**

Dans ce plasmide, la partie "gène de la β -glucoronidase de *E.coli.*" de pCG-13 est remplacée par un gène chimère de 2 kilobases contenant un peptide de transit optimisé, un gène d'EPSPS double mutant (Ile₁₀₂ + Ser₁₀₆) et un site de polyadénylation de la nopaline

synthase ("NOS") isolé de pRPA-RD-125. Pour obtenir pRPA-RD-198, on effectue la digestion de pCG-13 avec *EcoRI* suivie d'un traitement avec un fragment de Klenow d'ADN polymérase de *E.coli.*, selon les instructions du fabricant pour créer un fragment d'ADN à extrémité franche puis coupé avec *SmaI*. Le fragment d'ADN de 2 kilobases
5 contenant un peptide de transit optimisé, un gène d'EPSPS double mutant (Ile₁₀₂ + Ser₁₀₆) et un site de polyadénylation de la nopaline synthase ("NOS") est obtenu à partir de pRPA-RD-125 par digestion avec *NcoI* et *NotI*, suivie d'un traitement avec l'ADN polymérase de *E.coli.*, selon les instructions du fabricant pour créer un fragment d'ADN à extrémité franche. Ce fragment à extrémité franche est alors ligaturé dans pCG-13 préparé ci-dessus.

10 Ainsi on obtient un gène chimère de structure:

" promoteur H4A748 - intron n°2- PTO- gène EPSPS de maïs - NOS"

EXEMPLE 3: Expression de l'activité d'un gène rapporteur

1) Transformation et régénération

15 Le vecteur est introduit dans la souche non oncogène d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 disponible sur catalogue (Clontech #6027-1) par croisement triparental à l'aide du plasmide "helper" pRK 2013 dans *Escherichia coli* HB101 selon la procédure décrite par Bevan M. (1984) Nucl.Acids Res., 12, 8711-8721.

20 La technique de transformation à partir d'explants racinaires d'*Arabidopsis thaliana* L.-écotype C24 a été effectuée selon la procédure décrite par Valvekens D. et al. (1988) Proc.Natl.Acad.Sci USA, 85, 5536-5540. Brièvement, 3 étapes sont nécessaires: induction de la formation des cals sur milieu B5 de Gamborg complémenté de 2,4-D et de kinétine; formation de bourgeons sur milieu B5 de Gamborg complémenté de 2iP et d'IAA; enracinement et formation de graines sur MS sans hormones.

25

2) Mesure de l'activité GUS dans les plantes

a- observations histochimiques

La révélation de l'activité GUS par tache histochimique (Jefferson R.A. et al. (1987) EMBO J., 6, 3901-3907) sur des plantes transgéniques de 10 jours montre une
30 augmentation de l'intensité du patron histochimique spécifique de tissu pour les plasmides contenant les séquences d'intron (pCG-1 et pCG-13) par rapport à ceux sans ces introns (pRA-1). En particulier le patron de tache pour pCG-1 et pCG-13 est identique, montrant une augmentation d'intensité des taches des tissus vasculaires et méristématiques, feuilles et racines par rapport à celui de la construction pRA-1. Les constructions contenant
35 seulement les séquences d'intron n°1 (pCG-15 et pCG-18 montrent une tache histochimique extrêmement claire seulement dans la région du meristem apical.

b- mesures fluorométriques

L'activité GUS mesurée par fluorométrie sur des extraits de bourgeons floraux et de feuilles de la rosette (Jefferson R.A. et al. (1987) EMBO J., 6, 3901-3907) à partir de 12 plantes, montre que l'activité du promoteur H4A748 est augmentée sous l'influence des introns n° 1 et 2. Par rapport à la construction pRA-1, l'activité GUS de pCG-1 et pCG-13 sont au moins six fois supérieures dans les bourgeons floraux, vingt fois supérieures dans les feuilles de la rosette et vingt six fois supérieures dans les racines.

Ces mesures montrent clairement que l'introns n°1 and 2 de gènes d'histone d'arabidopsis de type "H3.3-like" utilisé comme zone de régulation induit une augmentation de l'activité de l'expression du gène chimère.

EXEMPLE 4: Tolérance de plantes transgéniques à un herbicide

1) Transformation et régénération

Le vecteur est introduit dans la souche non oncogène d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 disponible sur catalogue (Clontech #6027-1) par croisement triparental à l'aide du plasmide "helper" pRK 2013 dans *Escherichia coli* HB101 selon la procédure décrite par Bevan M. (1984) Nucl.Acids Res., 12, 8711-8721.

La technique de transformation à partir d'explants foliaires de tabac est basée sur la procédure décrite par Horsh R. et al. (1985) Science, 227, 1229-1231. La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA-France) à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30g/l de saccharose ainsi que 200µg/ml de kanamycine en trois étapes successives: la première comprend l'induction des pousses sur un milieu MS additionné de 30g de saccharose contenant 0,05mg d'acide naphtylacétique (ANA) et 2mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours. Les pousses formées au cours de cette étape sont ensuite développées par culture sur un milieu MS additionné de 30g/l de saccharose mais ne contenant pas d'hormone, pendant 10 jours. Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu d'enracinement MS dilué au demi, à teneur moitié en sels, vitamines et sucres et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

2) Mesure de la tolérance au glyphosate:

Vingt plantes transformées ont été régénérées et passées en serre pour chacune des constructions pRPA-RD-196, pRPA-RD-197 et pRPA-RD-198. Ces plantes ont été traitées en serre au stade 5 feuilles avec une suspension aqueuse de l'herbicide, vendu sous la marque RoundUp, correspondant à 0,8kg de matière active glyphosate par hectare.

Les résultats correspondent à l'observation d'indices de phytotoxicité relevés 3 semaine après traitement. Dans ces conditions, on constate que les plantes transformées par les constructions présentent en moyenne une tolérance acceptable (pRPA-RD-196) voire bonne (pRPA-RD-197 et pRPA-RD-198) alors que les plantes témoins non transformées sont complètement détruites.

Ces résultats montrent clairement l'amélioration apportée par l'utilisation d'un gène chimère selon l'invention pour un même gène codant pour la tolérance au glyphosate.

- Les plantes transformées selon l'invention peuvent être utilisées comme parents pour
- 5 l'obtention de lignées et d'hybrides ayant le caractère phénotypique correspondant à l'expression du gène chimère introduit.

Liste des séquences:

SEQ ID N° 1.

AATCAATTTC ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG AATTCGGGCC CGGGCGCGTG	60
ATCCGGCGGC GGCAGCGGCG GCGGCGGTGC AGGCGGGTGC CGAGGAGATC GTGCTGCAGC	120
CCATCAAGGA GATCTCCGGC ACCGTCAAGC TGCCGGGGTC CAAGTCGCTT TCCAACCGGA	180
TCCTCTACT CGCCGCCCTG TCCGAGGGGA CAACAGTGGT TGATAACCTG CTGAACAGTG	240
AGGATGTCCA CTACATGCTC GGGGCCTTGA GGA CTCTTGG TCTCTCTGTC GAAGCGGACA	300
AAGCTGCCAA AAGAGCTGTA GTTGTGGCT GTGGTGGAAA GTTCCAGTT GAGGATGCTA	360
AAGAGGAAGT GCAGCTCTTC TTGGGAATG CTGGAAGTGC AATCGGGCCA TTGACAGCAG	420
CTGTACTGTC TGCTGGTGA AATGCAACTT ACGTGCTTGA TGGAGTACCA AGAATGAGGG	480
AGAGACCCAT TGGCGACTTG GTTGTGGAT TGAAGCAGCT TGGTGCAGAT GTTGATTGTT	540
TCCTTGGCAC TGACTGCCCA CCTGTTCTG TCAATGGAAT CGGAGGGCTA CCTGGTGGCA	600
AGGTCAAGCT GTCTGGCTCC ATCAGCAGTC AGTACTTGAG TGCCTTGCTG ATGGCTGCTC	660
CTTTGGCTCT TGGGGATGTG GAGATTGAAA TCATTGATAA ATTAATCTCC ATTCCGTACG	720
TCGAAATGAC ATTGAGATTG ATGGAGCGTT TTGGTGTGAA AGCAGAGCAT TCTGATAGCT	780
GGGACAGATT CTACATTAAAG GGAGGTCAAA AATACAAGTC CCCTAAAAAT GCCTATGTTG	840
AAGGTGATGC CTCAGCGCA AGCTATTCT TGGCTGGTGC TGCAATTACT GGAGGGACTG	900
TGACTGTGGA AGGTTGTGGC ACCACCAGTT TGCAGGGTGA TGTGAAGTTT GCTGAGGTAC	960
TGGAGATGAT GGGAGCGAAG GTTACATGGA CCGAGACTAG CGTAACTGTT ACTGGCCCAC	1020
CGCGGGAGCC ATTTGGGAGG AAACACCTCA AGGCGATTGA TGTCAACATG AACAAGATGC	1080
CTGATGTGCG CATGACTCTT GCTGTGGTTG CCCTCTTTGC CGATGGCCCG ACAGCCATCA	1140
GAGACGTGGC TTCCTGGAGA GTAAAGGAGA CCGAGAGGAT GGTTCGGATC CGGACGGAGC	1200
TAACCAAGCT GGGAGCATCT GTTGAGGAAG GGCCGGACTA CTGCATCATC ACGCCGCCGG	1260
AGAAGCTGAA CGTGACGGCG ATCGACACGT ACGACGACCA CAGGATGGCC ATGGCCTTCT	1320
CCCTTGGCGC CTGTGCGGAG GTCCCGTCA CCATCCGGGA CCCTGGGTGC ACCCGGAAGA	1380
CCTTCCCCGA CTACTTCGAT GTGCTGAGCA CTTTCGTCAA GAATTAATAA AGCGTGCGAT	1440
ACTACCACGC AGCTTGATTG AAGTGATAGG CTTGTGCTGA GGAAATACAT TTCTTTTGT	1500
CTGTTTTTCT CTTTACGGG ATTAAGTTTT GAGTCTGTAA CGTTAGTTGT TTGTAGCAAG	1560
TTTCTATTTC GGATCTTAAG TTTGTGCACT GTAAGCCAAA TTTCAATTCA AGAGTGGTTC	1620
GTGGAATAA TAAGAATAAT AAATTACGTT TCAGTGAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1680
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AACCCGGGAA TTC	1713

SEQ ID N° 2.

CCATG GGC GGC GGC GAG GAG ATC GTG CTG CAG CCC ATC AAG GAG ATC Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile 1 5 10	47
TCC GGC ACC GTC AAG CTG CCG GGG TCC AAG TCG CTT TCC AAC CGG ATC Ser Gly Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile 15 20 25 30	95
CTC CTA CTC GCC GCC CTG TCC GAG GGG ACA ACA GTG GTT GAT AAC CTG Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu 35 40 45	143
CTG AAC AGT GAG GAT GTC CAC TAC ATG CTC GGG GCC TTG AGG ACT CTT Leu Asn Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu 50 55 60	191
GGT CTC TCT GTC GAA GCG GAC AAA GCT GCC AAA AGA GCT GTA GTT GTT Gly Leu Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val 65 70 75	239
GGC TGT GGT GGA AAG TTC CCA GTT GAG GAT GCT AAA GAG GAA GTG CAG Gly Cys Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln 80 85 90	287
CTC TTC TTG GGG AAT GCT GGA ACT GCA ATG CCG CCA TTG ACA GCA GCT Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala 95 100 105 110	335
GTT ACT GCT GCT GGT GGA AAT GCA ACT TAC GTG CTT GAT GGA GTA CCA Val Thr Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro 115 120 125	383
AGA ATG AGG GAG AGA CCC ATT GGC GAC TTG GTT GTC GGA TTG AAG CAG Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln 130 135 140	431
CTT GGT GCA GAT GTT GAT TGT TTC CTT GGC ACT GAC TGC CCA CCT GTT Leu Gly Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val 145 150 155	479
CGT GTC AAT GGA ATC GGA GGG CTA CCT GGT GGC AAG GTC AAG CTG TCT Arg Val Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser 160 165 170	527
GGC TCC ATC AGC AGT CAG TAC TTG AGT GCC TTG CTG ATG GCT GCT CCT Gly Ser Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro 175 180 185 190	575
TTG GCT CTT GGG GAT GTG GAG ATT GAA ATC ATT GAT AAA TTA ATC TCC Leu Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser 195 200 205	623
ATT CCG TAC GTC GAA ATG ACA TTG AGA TTG ATG GAG CGT TTT GGT GTG Ile Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val 210 215 220	671
AAA GCA GAG CAT TCT GAT AGC TGG GAC AGA TTC TAC ATT AAG GGA GGT Lys Ala Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly 225 230 235	719

SEQ ID N° 2 (suite).

CAA AAA TAC AAG TCC CCT AAA AAT GCC TAT GTT GAA GGT GAT GCC TCA Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser 240 245 250	767
AGC GCA AGC TAT TTC TTG GCT GGT GCT GCA ATT ACT GGA GGG ACT GTG Ser Ala Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val 255 260 265 270	815
ACT GTG GAA GGT TGT GGC ACC ACC AGT TTG CAG GGT GAT GTG AAG TTT Thr Val Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe 275 280 285	863
GCT GAG GTA CTG GAG ATG ATG GGA GCG AAG GTT ACA TGG ACC GAG ACT Ala Glu Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr 290 295 300	911
AGC GTA ACT GTT ACT GGC CCA CCG CCG GAG CCA TTT GGG AGG AAA CAC Ser Val Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His 305 310 315	959
CTC AAG GCG ATT GAT GTC AAC ATG AAC AAG ATG CCT GAT GTC GCC ATG Leu Lys Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met 320 325 330	1007
ACT CTT GCT GTG GTT GCC CTC TTT GCC GAT GGC CCG ACA GCC ATC AGA Thr Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg 335 340 345 350	1055
GAC GTG GCT TCC TGG AGA GTA AAG GAG ACC GAG AGG ATG GTT GCG ATC Asp Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile 355 360 365	1103
CGG ACG GAG CTA ACC AAG CTG GGA GCA TCT GTT GAG GAA GGG CCG GAC Arg Thr Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp 370 375 380	1151
TAC TGC ATC ATC ACG CCG CCG GAG AAG CTG AAC GTG ACG GCG ATC GAC Tyr Cys Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp 385 390 395	1199
ACG TAC GAC GAC CAC AGG ATG GCC ATG GCC TTC TCC CTT GCC GCC TGT Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys 400 405 410	1247
GCC GAG GTC CCC GTC ACC ATC CCG GAC CCT GGG TGC ACC CCG AAG ACC Ala Glu Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr 415 420 425 430	1295
TTC CCC GAC TAC TTC GAT GTG CTG AGC ACT TTC GTC AAG AAT Phe Pro Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn 435 440	1337
TAA	1340

SEQ ID N° 3.

Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu
 20 25 30
 Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn
 35 40 45
 Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu
 50 55 60
 Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys
 65 70 75 80
 Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln Leu Phe
 85 90 95
 Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Thr
 100 105 110
 Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met
 115 120 125
 Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly
 130 135 140
 Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val Arg Val
 145 150 155 160
 Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser
 165 170 175
 Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala
 180 185 190
 Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser Ile Pro
 195 200 205
 Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Lys Ala
 210 215 220
 Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys
 225 230 235 240
 Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala
 245 250 255
 Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val
 260 265 270
 Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu
 275 280 285
 Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr Ser Val
 290 295 300
 Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys
 305 310 315 320
 Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu
 325 330 335
 Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val
 340 345 350
 Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys
 370 375 380
 Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr
 385 390 395 400
 Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu
 405 410 415
 Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro
 420 425 430
 Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
 435 440

SEQ ID N° 4.

CCATG GCC GGC GCC GAG GAG ATC GTG CTG CAG CCC ATC AAG GAG ATC Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile 1 5 10	47
TCC GGC ACC GTC AAG CTG CCG GGG TCC AAG TCG CTT TCC AAC CGG ATC Ser Gly Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile 15 20 25 30	95
CTC CTA CTC GCC GCC CTG TCC GAG GGG ACA ACA GTG GTT GAT AAC CTG Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu 35 40 45	143
CTG AAC AGT GAG GAT GTC CAC TAC ATG CTC GGG GCC TTG AGG ACT CTT Leu Asn Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu 50 55 60	191
GGT CTC TCT GTC GAA GCG GAC AAA GCT GCC AAA AGA GCT GTA GTT GTT Gly Leu Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val 65 70 75	239
GGC TGT GGT GGA AAG TTC CCA GTT GAG GAT GCT AAA GAG GAA GTG CAG Gly Cys Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln 80 85 90	287
CTC TTC TTG GGG AAT GCT GGA ATC GCA ATG CGG TCC TTG ACA GCA GCT Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ser Leu Thr Ala Ala 95 100 105 110	335
GTT ACT GCT GCT GGT GGA AAT GCA ACT TAC GTG CTT GAT GGA GTA CCA Val Thr Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro 115 120 125	383
AGA ATG AGG GAG AGA CCC ATT GGC GAC TTG GTT GTC GGA TTG AAG CAG Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln 130 135 140	431
CTT GGT GCA GAT GTT GAT TGT TTC CTT GGC ACT GAC TGC CCA CCT GTT Leu Gly Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val 145 150 155	479
CGT GTC AAT GGA ATC GGA GGG CTA CCT GGT GGC AAG GTC AAG CTG TCT Arg Val Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser 160 165 170	527
GGC TCC ATC AGC AGT CAG TAC TTG AGT GCC TTG CTG ATG GCT GCT CCT Gly Ser Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro 175 180 185 190	575
TTG GCT CTT GGG GAT GTG GAG ATT GAA ATC ATT GAT AAA TTA ATC TCC Leu Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser 195 200 205	623
ATT CCG TAC GTC GAA ATG ACA TTG AGA TTG ATG GAG CGT TTT GGT GTG Ile Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val 210 215 220	671
AAA GCA GAG CAT TCT GAT AGC TGG GAC AGA TTC TAC ATT AAG GGA GGT Lys Ala Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly 225 230 235	719

SEQ ID N° 4 (suite).

CAA AAA TAC AAG TCC CCT AAA AAT GCC TAT GTT GAA GGT GAT GCC TCA Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser 240 245 250	767
AGC GCA AGC TAT TTC TTG GCT GGT GCT GCA ATT ACT GGA GGG ACT GTG Ser Ala Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val 255 260 265 270	815
ACT GTG GAA GGT TGT GGC ACC ACC AGT TTG CAG GGT GAT GTG AAG TTT Thr Val Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe 275 280 285	863
GCT GAG GTA CTG GAG ATG ATG GGA GCG AAG GTT ACA TGG ACC GAG ACT Ala Glu Val Leu Glu Met Met Gly Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr 290 295 300	911
AGC GTA ACT GTT ACT GGC CCA CCG CGG GAG CCA TTT GGG AGG AAA CAC Ser Val Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His 305 310 315	959
CTC AAG GCG ATT GAT GTC AAC ATG AAC AAG ATG CCT GAT GTC GCC ATG Leu Lys Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met 320 325 330	1007
ACT CTT GCT GTG GTT GCC CTC TTT GCC GAT GGC CCG ACA GCC ATC AGA Thr Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg 335 340 345 350	1055
GAC GTG GCT TCC TGG AGA GTA AAG GAG ACC GAG AGG ATG GTT GCG ATC Asp Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Thr Arg Met Val Ala Ile 355 360 365	1103
CGG ACG GAG CTA ACC AAG CTG GGA GCA TCT GTT GAG GAA GGG CCG GAC Arg Thr Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp 370 375 380	1151
TAC TGC ATC ATC ACG CCG CCG GAG AAG CTG AAC GTG ACG GCG ATC GAC Tyr Cys Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp 385 390 395	1199
ACG TAC GAC GAC CAC AGG ATG GCG ATG GCC TTC TCC CTT GCC GCC TGT Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys 400 405 410	1247
GCC GAG GTC CCC GTC ACC ATC CCG GAC CCT GGG TGC ACC CCG AAG ACC Ala Glu Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr 415 420 425 430	1295
TTC CCC GAC TAC TTC GAT GTG CTG AGC ACT TTC GTC AAG AAT Phe Pro Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn 435 440	1337
TAA	1340

SEQ ID N° 5.

Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu
 20 25 30
 Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn
 35 40 45
 Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu
 50 55 60
 Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys
 65 70 75 80
 Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln Leu Phe
 85 90 95
 Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ser Leu Thr Ala Ala Val Thr
 100 105 110
 Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met
 115 120 125
 Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly
 130 135 140
 Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val Arg Val
 145 150 155 160
 Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser
 165 170 175
 Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala
 180 185 190
 Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser Ile Pro
 195 200 205
 Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Lys Ala
 210 215 220
 Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys
 225 230 235 240
 Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala
 245 250 255
 Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val
 260 265 270
 Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu
 275 280 285
 Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr Ser Val
 290 295 300
 Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys
 305 310 315 320
 Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu
 325 330 335
 Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val
 340 345 350
 Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys
 370 375 380
 Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr
 385 390 395 400
 Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu
 405 410 415
 Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro
 420 425 430
 Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
 435 440

SEQ ID N° 6.

TGAGGTACGA TTCTTCGATC CTCTTTGATT TTCCTGGAAA TATTTTTCG GTGATCGTGA	60
AACTACTGGA ATCGCTCGAT AGGTGGTACG AAATTAGGCG AGATTAGTTT CTATTCTTGG	120
CCATTATCTT GTTCTTCGCG CGAATGATCT TCCGTATAAA GATTTTAGGT TAGAGATGAA	180
TCGTATAGCT AGATTTCATC ACCAGATAGT TTCTTTGTCT AGAATCTCTG AAATTCTCGA	240
TAGTTTTCAC ATGTGTAAAT AGATTGTTCT TATTCGGCGA TTGTGATTA GGGTTTGGAT	300
TTTCTTGATT ATGCGATTGC AATTAGGGAT TTTCTTTGGT TTTGTGTGA TCTTACGATA	360
CATTCCTGCA ATTGAATACG TATGGATCTA AATCTTGTTA ATTTGTTGAA CAGATCCC	418

SEQ ID N° 7.

CTCAGGCGAA GAACAGGTAT GATTTGTTTG TAATTAGATC AGGGGTTTAG GTCTTTCCAT	60
TACTTTTTAA TGTTTTTTCT GTTACTGTCT CCGCGATCTG ATTTTACGAC AATAGAGTTT	120
CGGGTTTTGT CCCATTCCAG TTGAAAATA AAGGTCCGTC TTTTAAGTTT GCTGGATCGA	180
TAAACCTGTG AAGATTGAGT CTAGTCGATT TATTGGATGA TCCATTCTTC ATCGTTTTTT	240
TCTTGCTTCG AAGTTCGTGA TAACCAGATT TGTCGTGTG CGATTGTCAT TACCTAGCCG	300
TGTATCGAGA ACTAGGGTTT TCGAGTCAAT TTGCCCCCTT TTGGTTATAT CTGGTTCGAT	360
AACGATTCAT CTGGATTAGG GTTTTAAGTG GTGACGTTTA GTATTCCAAT TTCTCAAAA	420
TTTAGTTATG GATAATGAAA ATCCCAATT GACTGTTCAA TTTCTTGTTA AATGCCGAGA	480
TCCCGGGATC TGCG	494

REVENDICATIONS

- 1) Séquence ADN isolée pouvant servir de zone de régulation dans un gène chimère utilisable pour la transformation des plantes et permettant l'expression du produit de traduction du gène chimère en particulier dans les régions de la plante en croissance rapide, caractérisée en ce qu'elle comprend dans le sens de la transcription du gène chimère, au moins un intron tel que le premier intron (intron 1) de la région 5' non-codante d'un gène d'histone végétale.
- 2) Séquence ADN selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'intron 1 d'histone provient d'un gène d'histone végétale du type "H3.3-like"
- 3) Séquence ADN selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que l'intron 1 d'histone provient d'une plante dicotylédone.
- 4) Séquence ADN selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'intron 1 d'histone provient d'*Arabidopsis thaliana*.
- 5) Séquence ADN selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que l'intron 1 d'histone provient d'une plante monocotylédone.
- 6) Séquence ADN selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'intron 1 d'histone provient de *Zea mays*.
- 7) Séquence ADN selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'intron 1 est orienté, dans le sens de la transcription du gène chimère, de façon directe ou inversée relativement à son orientation initiale dans le sens de la transcription du gène dont il est issu.
- 8) Séquence ADN selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que la zone de régulation comprend deux introns-1, identiques ou différents, associés.
- 9) Gène chimère pour la transformation des plantes comprenant au moins, dans le sens de la transcription, une zone de régulation comprenant une zone promotrice, une séquence d'un gène de tolérance herbicide et une zone de régulation, caractérisé en ce que la zone de régulation comprend en outre un intron 1 selon l'une des revendications 1 à 8.

10) Gène chimère selon la revendication 9, caractérisé en ce que la zone promotrice provient d'un promoteur de gène d'histone végétale.

11) Gène chimère selon l'une des revendications 9 et 10, caractérisé en ce que la zone promotrice provient du même gène d'histone végétale que le l'intron 1.

12) Gène chimère selon l'une des revendications 9 à 11, caractérisé en ce que la zone promotrice comprend un promoteur d'histone végétale dupliquée.

13) Gène chimère selon l'une des revendications 9 à 12, caractérisé en ce que la zone promotrice contient au moins un promoteur d'un gène d'histone végétale associé à un promoteur différent issu d'un gène pouvant s'exprimer naturellement dans les plantes.

14) Gène chimère selon l'une des revendications 9 à 13, caractérisé en ce que le gène codant permet de conférer aux plantes une tolérance accrue vis à vis d'un herbicide.

15) Gène chimère selon la revendication 14, caractérisé en ce que le gène de tolérance herbicide est fusionné à une séquence ADN codant pour une zone peptide de transit permettant l'accumulation du produit de la traduction du gène de tolérance herbicide dans un compartiment subcellulaire.

16) Gène chimère selon la revendication 15, caractérisé en ce que la zone peptide de transit permet l'accumulation du produit de la traduction du gène de tolérance herbicide dans le compartiment plastidial.

17) Gène chimère selon la revendication 16, caractérisé en ce que la zone peptide de transit comprend, dans le sens de la transcription, au moins un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, éventuellement une partie de séquence de la partie mature N-terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis éventuellement un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale.

18) Gène chimère selon l'une des revendications 9 à 17, caractérisé en ce que le gène de tolérance herbicide code pour une enzyme active vis à vis d'herbicides dont la cible est l'EPSPS.

19) Gène chimère selon la revendication 18, caractérisé en ce que le gène de tolérance herbicide code pour une enzyme active vis à vis du glyphosate.

- 20) Vecteur pour la transformation des plantes, caractérisé en ce qu'il comprend un gène chimère selon l'une des revendications 9 à 19.
- 5 21) Souche d'*Agrobacterium* sp., caractérisée en ce qu'elle contient un vecteur selon la revendication 20.
- 22) Cellule végétale transformée, caractérisée en ce qu'elle contient un gène chimère selon l'une des revendications 9 à 19.
- 10 23) Plante ou partie de plante transformée obtenue à partir d'une cellule selon la revendication 22.
- 15 24) Procédé de construction d'un gène chimère selon l'une des revendications 9 à 23, caractérisé en ce qu'on isole respectivement un l'intron 1 d'un gène d'histone végétale selon l'une des revendications 1 à 8, une zone promotrice, une zone peptide de transit, ainsi qu'au moins un transgène, et que ensuite on les assemble dans le sens de la transcription du transgène.

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/82, 15/29, 15/54, 5/10, A01H 5/00		A3	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/04114
			(43) Date de publication internationale: 6 février 1997 (06.02.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01109			(81) Etats désignés: AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Date de dépôt international: 17 juillet 1996 (17.07.96)			
(30) Données relatives à la priorité: 95/08980 19 juillet 1995 (19.07.95) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE POULENC AGROCHIMIE [FR/FR]; 14-20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DEROSE, Richard [FR/FR]; 216, rue de Saint-Cyr, F-69009 Lyon (FR). CHAUBET, Nicole [FR/FR]; Esc. C, 13 A, boulevard Wilson, F-67800 Strasbourg (FR). GIGOT, Claude [FR/FR]; Esc. C, 13 A, boulevard Wilson, F-67800 Strasbourg (FR).			
(74) Représentant commun: RHONE POULENC AGROCHIMIE; Boîte postale 9163, F-69263 Lyon Cédex 09 (FR).			Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 20 mars 1997 (20.03.97)			
(54) Title: ISOLATED DNA SEQUENCE FOR USE AS A REGULATOR REGION IN A CHIMERIC GENE USEFUL FOR TRANSFORMING PLANTS			
(54) Titre: SEQUENCE ADN ISOLÉE POUVANT SERVIR DE ZONE DE REGULATION DANS UN GENE CHIMERE UTILISABLE POUR LA TRANSFORMATION DES PLANTES			
(57) Abstract			
A chimeric gene for transforming plants is disclosed. The gene includes, in the transcription direction, at least one promoter region, one transgene and one regulator region. Said regulator region consists of at least one intron 1 in the non-coding 5' region of a plant histone gene enabling expression of the protein in rapid growth regions. The production of transgenic plants is also disclosed.			
(57) Abrégé			
Séquence ADN isolée pouvant servir de zone de régulation dans un gène chimère utilisable pour la transformation des plantes, 1) gène chimère utilisable pour la transformation des plantes. 2) Il comprend au moins, dans le sens de la transcription, une zone promotrice, un transgène et une zone de régulation, caractérisé en ce que la zone de régulation est constituée d'au moins un intron (1) dans la région 5' non-codant d'un gène d'histone végétale permettant l'expression de la protéine dans les zones de croissance rapide. 3) Production de plantes transgéniques.			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brsil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC 1/FR 96/01109

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C12N15/29 C12N15/54 C12N5/10 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 21, pages 595-605, XP002023307 SUNDAS, A., ET AL.: "cDNA sequence and expression of an intron-containing histone H2A gene from Norway spruce, Picea abies" see the whole document ---	1,3
A	JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 225, pages 569-574, XP002023308 CHAUBET, N., ET AL.: "Genes encoding a histone H3.3-like variant in Arabidopsis contain intervening sequences" see the whole document --- -/--	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

* "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 January 1997

Date of mailing of the international search report

04.02.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC./FR 96/01109

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 507 698 (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 7 October 1992 see the whole document ---	9,10, 12-15, 18-23
A	WO,A,95 06128 (DEKALB GENETICS CORP) 2 March 1995 see page 119, line 16 - page 120, line 20 see page 150, line 14 - line 23 see page 166, line 4 - page 167, line 19 ---	9,10, 12-15, 18-23
A	EP,A,0 652 286 (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 10 May 1995 see page 7, line 43 - line 47 ---	9,14, 16-24
A	EP,A,0 508 909 (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 14 October 1992 see the whole document ---	17
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 18, no. 23, pages 6767-6770, XP002023309 TANAKA, A., ET AL.: "Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco is correlated with an increased level of mRNA and an efficient splicing of the intron" see the whole document ---	1
A	PROGRESS IN NUCLEIC ACID RESEARCH AND MOLECULAR BIOLOGY, vol. 42, pages 229-257, XP002023310 SINIBALDI, R.M., ET AL.: "Intron splicing and intron-mediated enhanced expression in monocots" see the whole document ---	1
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 14, no. 22, pages 8845-8862, XP002023311 SEILER-TUYNS, A., ET AL.: "A chimeric mouse histone H4 gene containing either an intron or poly(a)addition signal behaves like a basal histone" see the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC/FR 96/01109

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP-A-0507698	07-10-92	FR-A-	2673642	11-09-92
		AU-B-	652417	25-08-94
		AU-A-	1144392	10-09-92
		CA-A-	2061835	06-09-92
		JP-A-	5076369	30-03-93
		US-A-	5491288	13-02-96

WO-A-9506128	02-03-95	AU-A-	7716994	21-03-95
		CA-A-	2170260	02-03-95
		EP-A-	0721509	17-07-96
		ZA-A-	9406488	30-11-95

EP-A-0652286	10-05-95	FR-A-	2712302	19-05-95
		AU-A-	7775194	18-05-95
		BG-A-	99169	28-07-95
		BR-A-	9404562	20-06-95
		CA-A-	2135461	11-05-95
		CN-A-	1121958	08-05-96
		CZ-A-	9402743	13-09-95
		HU-A-	70464	30-10-95
		JP-A-	7184664	25-07-95
		NZ-A-	264879	28-10-96
		PL-A-	305775	15-05-95
		SK-A-	134094	07-06-95
		ZA-A-	9408826	17-07-95

EP-A-0508909	14-10-92	FR-A-	2673643	11-09-92
		AU-B-	652610	01-09-94
		AU-A-	1144292	10-09-92
		CA-A-	2061636	06-09-92
		JP-A-	5095789	20-04-93
		US-A-	5510471	23-04-96

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document International No

PC1/FR 96/01109

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/82 C12N15/29 C12N15/54 C12N5/10 A01H5/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N A01H		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 21, pages 595-605, XP002023307 SUNDAS, A., ET AL.: "cDNA sequence and expression of an intron-containing histone H2A gene from Norway spruce, Picea abies" voir le document en entier ---	1,3
A	JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 225, pages 569-574, XP002023308 CHAUBET, N., ET AL.: "Genes encoding a histone H3.3-like variant in Arabidopsis contain intervening sequences" voir le document en entier --- <div style="text-align: center;">-/-</div>	1-4
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cite pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">22 Janvier 1997</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">4. 02. 97</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Maddox, A</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dernière Internationale No

PCT/FR 96/01109

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP,A,0 507 698 (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 7 Octobre 1992 voir le document en entier ---	9,10, 12-15, 18-23
A	WO,A,95 06128 (DEKALB GENETICS CORP) 2 Mars 1995 voir page 119, ligne 16 - page 120, ligne 20 voir page 150, ligne 14 - ligne 23 voir page 166, ligne 4 - page 167, ligne 19 ---	9,10, 12-15, 18-23
A	EP,A,0 652 286 (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 10 Mai 1995 voir page 7, ligne 43 - ligne 47 ---	9,14, 16-24
A	EP,A,0 508 909 (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 14 Octobre 1992 voir le document en entier ---	17
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 18, no. 23, pages 6767-6770, XP002023309 TANAKA, A., ET AL.: "Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco is correlated with an increased level of mRNA and an efficient splicing of the intron" voir le document en entier ---	1
A	PROGRESS IN NUCLEIC ACID RESEARCH AND MOLECULAR BIOLOGY, vol. 42, pages 229-257, XP002023310 SINIBALDI, R.M., ET AL.: "Intron splicing and intron-mediated enhanced expression in monocots" voir le document en entier ---	1
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 14, no. 22, pages 8845-8862, XP002023311 SEILER-TUYNS, A., ET AL.: "A chimeric mouse histone H4 gene containing either an intron or poly(a) addition signal behaves like a basal histone" voir le document en entier -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à : Membres de familles de brevets

Der. te Internationale No

PCI/FR 96/01109

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP-A-0507698	07-10-92	FR-A-	2673642	11-09-92
		AU-B-	652417	25-08-94
		AU-A-	1144392	10-09-92
		CA-A-	2061835	06-09-92
		JP-A-	5076369	30-03-93
		US-A-	5491288	13-02-96

WO-A-9506128	02-03-95	AU-A-	7716994	21-03-95
		CA-A-	2170260	02-03-95
		EP-A-	0721509	17-07-96
		ZA-A-	9406488	30-11-95

EP-A-0652286	10-05-95	FR-A-	2712302	19-05-95
		AU-A-	7775194	18-05-95
		BG-A-	99169	28-07-95
		BR-A-	9404562	20-06-95
		CA-A-	2135461	11-05-95
		CN-A-	1121958	08-05-96
		CZ-A-	9402743	13-09-95
		HU-A-	70464	30-10-95
		JP-A-	7184664	25-07-95
		NZ-A-	264879	28-10-96
		PL-A-	305775	15-05-95
		SK-A-	134094	07-06-95
		ZA-A-	9408826	17-07-95

EP-A-0508909	14-10-92	FR-A-	2673643	11-09-92
		AU-B-	652610	01-09-94
		AU-A-	1144292	10-09-92
		CA-A-	2061636	06-09-92
		JP-A-	5095789	20-04-93
		US-A-	5510471	23-04-96
